

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-163341

(43)Date of publication of application : 27.06.1995

(51)Int.Cl.

C12N 9/04
C07K 14/00
C12N 15/09
// C07K 1/107
(C12N 9/04
C12R 1:19)
(C12N 15/09
C12R 1:06)

(21)Application number : 05-315328

(71)Applicant : TOYOB0 CO LTD

(22)Date of filing : 15.12.1993

(72)Inventor : NISHIYA YOSHIAKI
TEJIMA SHINICHI
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) STABILIZED AND MODIFIED PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a modified protein in which a base capable of coding the cysteine residue in the amino acid sequence constituting a parent protein is substituted by other amino acids and the stability to metallic ions and other biological components is enhanced.

CONSTITUTION: This modified protein is obtained by preparing a DNA having genetic information about the modified protein in which a base capable of coding the cysteine residue in a DNA having the genetic information about a parent protein is substituted by a base capable of coding other amino acids (preferably serine, alanine, aspartic acid or arginine), transducing the resultant recombinant plasmid containing the DNA integrated therewith into a host cell and culturing the prepared transformant in a nutrient culture medium.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 03.06.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3132618

[Date of registration] 24.11.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特閑平7-163341

(43)公開日 平成7年(1995)6月27日

(51)Int.Cl. 聽別記号 売内整痘淫号 P I 技術表示箇所
 C12N 9/04 Z
 C07K 14/00 8318-4H
 C12N 15/09 ZNA
 9281-4B C12N 15/00 ZNA A
 (C12N 15/00 ZNA A
 審査請求 未請求 請求項の数 9 OL (全 10 頁) 最終頁に絶ぐ

(21)出願番号	特願平5-315328	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区豊島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成5年(1993)12月15日	(72)発明者	西矢 芳昭 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社教習バイオ研究所内
		(72)発明者	手嶋 真一 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社教習バイオ研究所内
		(72)発明者	川村 進久 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社教習バイオ研究所内

(54) [発明の名称] 安定化された改変タンパク質

(57) [要約]

【目的】銀イオン(Ag⁺)、水銀イオン(Hg²⁺)等の金属イオンまたは生体内における他の成分に対するタンパク質の安定性を向上させる。

【構成】親タンパク質、例えばザルコシンオキシダーゼを構成するアミノ酸配列中のシスティン残基が他のアミノ酸、例えばセリン、アラニン、アスパラギン酸またはアルギニンに置換された安定化された改変タンパク質および該改変タンパク質を過伝子工学的に部位特異的変異させることにより製造する方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 親タンパク質を構成するアミノ酸配列中のシスティン残基が他のアミノ酸に置換されたことを特徴とする安定化された改変タンパク質。

【請求項2】 他のアミノ酸がセリン、アラニン、アスパラギン酸またはアルギニンであることを特徴とする請求項1記載の安定化された改変タンパク質。

【請求項3】 親タンパク質がザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項1記載の安定化された改変タンパク質。

【請求項4】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質が配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列中の第265番目のシスティン残基が他のアミノ酸に置換されたことを特徴とする請求項1記載の安定化された改変タンパク質。

【請求項5】 親タンパク質の遺伝情報を有するDNA中のシスティン残基をコードする塩基を他のアミノ酸をコードする塩基で置換した改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAを作成し、該DNAを組み込んだ組換えプラスミドを宿主細胞へ導入し、得られた形質転換体を栄養培地にて培養し、改変タンパク質を採取することを特徴とする安定化された改変タンパク質の製造法。

【請求項6】 他のアミノ酸がセリン、アラニン、アスパラギン酸またはアルギニンであることを特徴とする請求項5記載の安定化された改変タンパク質の製造法。

【請求項7】 親タンパク質がザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質であり、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項5記載の安定化された改変タンパク質の製造法。

【請求項8】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質が配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列中の第265番目のシスティン残基をコードする塩基が他のアミノ酸をコードする塩基に置換されたことを特徴とする請求項7記載の安定化された改変タンパク質の製造法。

【請求項9】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する親タンパク質の遺伝情報を有するDNAが配列表・配列番号2に記載されたDNAを含有することを特徴とする請求項7記載の安定化された改変タンパク質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、金属イオンまたは他の生体成分に対する安定性が増強された改変タンパク質およびその製法に関する。

【0002】

【従来の技術】 酵素を主とした産業上利用されるタンパク質の多くは、銀イオン(A⁺)、水銀イオン(Hg²⁺)等の金属イオン、または目的のタンパク質を生産する生体内における他の成分に対して安定性が充分ではない。このことは、目的のタンパク質を生産する生体の増

2

殖過程において、該タンパク質が本来有する機能を損なう原因となり得るため、解決が望まれていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は銀イオン(A⁺)、水銀イオン(Hg²⁺)等の金属イオンまたは生体内における他の成分に対するタンパク質の安定性を向上させることを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記目的を達成するため、既往研究を重ね、親タンパク質のアミノ酸を改変することにより、本発明を完成了。

【0005】 すなわち本発明は親タンパク質を構成するアミノ酸配列中のシスティン残基が他のアミノ酸に置換されたことを特徴とする安定化された改変タンパク質である。

【0006】 また本発明は親タンパク質の遺伝情報を有するDNA中のシスティン残基をコードする塩基を他のアミノ酸をコードする塩基で置換した改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAを作成し、該DNAを組み込んだ組換えプラスミドを宿主細胞へ導入し、得られた形質転換体を栄養培地にて培養し、改変タンパク質を採取することを特徴とする安定化された改変タンパク質の製造法である。

【0007】 本発明の親タンパク質としては、システィンを有するタンパク質であって、DNA配列またはアミノ酸配列が既知のタンパク質であればよく、例えば酵素、生理活性タンパク(ホルモン、成長因子)などが挙げられる。酵素の例としては、ザルコシンオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、コレステロールオキシダーゼなどが挙げられる。

【0008】 親タンパク質を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、親タンパク質の遺伝情報を有するDNA中のシスティン残基をコードする塩基を、他のアミノ酸残基をコードする塩基に変換することにより、システィン残基が他のアミノ酸に置換された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAが作成される。他のアミノ酸としては、セリン、アラニン、アスパラギン酸、アルギニンなどが挙げられる。

【0009】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する親タンパク質の一例は配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列中の第265番目がシスティン残基を有する。また該アミノ酸配列をコードする塩基配列の一例は、配列表・配列番号2に記載されている。アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質については、Journal of Bacteriology, vol.169 P.2591 (1987), ibid., vol.174 P.1397 (1992)などに記載されている。またコレステロールオキシダーゼ活性を有するタンパク質については、Journal of Bacteriology, vol.171 P.595 (1989), Journal of Molecular Bio

lody, vol.219 P.533 (1991)などに記載されている。
【0010】DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(TransformerTM; Clonetech 製, T7-GEN インビトロミュータゲネシス Kit; Stratagene 製)の使用、或いはPCR法の利用が挙げられる。

【0011】具体的にはまず親タンパク質を产生する細胞から染色体DNAを分離する。得られた染色体DNAを制限酵素、例えばSau3AIで部分分解反応させ、断片に分解した後、同じ制限酵素で切断したプラスミドとDNAリガーゼによりDNAを連結する。連結したDNAはエシェリヒア・コリーのコンピテントセルを用いて形質転換する。得られたコロニーは培地で培養し、遺伝子が挿入された組換えDNAをスクリーニングする。次いで挿入DNA断片を複数の制限酵素により切断して他のプラスミドにサブクローニングし、挿入DNA断片を有するプラスミドを得る。種々のサブクローニングは常法に従い、SEQUENCING VERSION2.0 7-deaza-dGTP kit(京洋紡製)を用いて、配列決定を行う。

【0012】次いでシステインをコードする塩基を他のアミノ酸をコードする塩基に置換したオリゴヌクレオチドおよびTransformerTM(Clontech製)を用い、TransformerTMのプロトコールに従い、システイン残基が他のアミノ酸に置換された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAを作成する。

【0013】作成された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。

【0014】この際、プラスミドとしては、例えばエシエリヒア・コリーを宿主微生物とする場合にはpBluescript, pUC18などが使用できる。

【0015】宿主微生物としては、例えばエシェリヒア・コリー W3110, エシェリヒア・コリー C600, エシェリヒア・コリー JM109, エシェリヒア・コリー DH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。

【0016】形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生産的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養を行なうが、工業的には通気搅拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通用されるものが広く使用され得る。炭素源としては炭化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、ショ糖、ラクトース、

マルトース、フラクトース、糖蜜、ビルピン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0017】培養温度は菌が発育し、改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリーの場合、好ましくは20~42°C程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は5~48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0018】培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は通過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物を遠心または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチムなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0019】この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を例えば凝固濾過、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濃過剤などによるゲル濃過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーにより、精製された改変タンパク質を得る事ができる。

【0020】
【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、ザルコシンオキシダーゼの活性測定は以下のようになつた。すなわち、48mMトリス緩衝液(pH 8.0)、95mMザルコシン、0.47mM-L-アミノアンチピリジン、2.0mMフェノール、0.045%トリトンX-100、4.5U/mlペルオキシダーゼ中で酵素を37°C、10分反応させ、500nmにおける吸光度を測定する。酵素活性の1単位は、この条件下で1分間当たり1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量とした。

【0021】実施例1 改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAの作成
ザルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有する組換え体ブ

ラスミド、pSAGEP3 は以下の方法により作成した。アースロバクター・エスピー・T E 1826 (微工研菌奇第 1 0637号) の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100mlの2×YT培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2)で37°Cで振盪培養後、遠心(3000 rpm、10分)により集菌した。15mMケン酸ナトリウム、0.15%塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20%シュークロース、1mMEDTA、50mMトリス塩酸(pH 7.5)を含んだ溶液 5mlに懸濁させ。0.5mlのリゾチーム溶液(100mg/ml)を加えて37°C、30分間保温した。次いで1mlの1%ラウロイルサルコシン酸、0.1mMEDTA(pH9.5)を含む溶液を加えた。この懸濁液に臭化エチジウム溶液を0.5%臭化セシウムを約100倍加え、振拌混台し、55,000rpm、20時間の超遠心でDNAを分取した。分取したDNAは、10mMトリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTAを含んだ溶液(TE)で透析し、精製DNA標品とした。エシェリヒア・コリーJM109のコンピテントセルはHanahanの方法により作成し、ライブラー作成の宿主として用いた。

【0022】染色体DNA 1μgを制限酵素Sau3AI(東洋紡製)で部分分解反応させ、2kb以上の断片に分解した後、Sal I(東洋紡製)で切断したpUC18 0.5 μgとM.G.LoftusらのBACKFILLING法(BioTechniques Vol12, No.2(1992))に従い、T4-DNAリガーゼ(東洋紡製)1ユニットで15°C、12時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリーJM109のコンピテントセルを用いて形質転換した。使用したDNA 1μg当たり約1×10⁶個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは50μg/mlアンビシリン、0.5%ザルコシン、0.005%バラロースアニリン、及び0.02%ソディウムハイドロジェンサルファイト入りし培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)で37°C、18時間培養し、赤色コロニーを指標にザルコシンオキシダーゼ遺伝子の入った組換えDNAをスクリーニングした。

【0023】その結果、約1,000個のコロニーのうち1株の割合で赤色を示すコロニーを得た。この中の1株が保有するプラスミドには約8.7kbの挿入DNA断片が存在しており、このプラスミドをpSAGE1とした。次いでpSAGE1より挿入DNA断片を種々の制限酵素により切断し

てpUC18にサブクローニングし、約1.7kbの挿入DNA断片を有するpSAGEP3を得た。pSAGEP3の約1.7kbの挿入DNA断片について種々の制限酵素で切断してサブクローンを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、SEQUENASE VERSION2.07-deaza-dGTP kit(東洋紡製)を用いて、配列の決定を行った。決定したアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示した(Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244(1993)を参照)。

【0024】次いで配列表の配列番号3、4、5、6のオリゴヌクレオチドおよびTransformerTM(Clontech製)を用い、TransformerTMのプロトコールに従い、配列表・配列番号1に記載の第265番目のシステイン残基がセリン、アラニン、アスパラギン酸、アルギニンにそれぞれ置換された変異ザルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有するDNAを作成した。変異タンパク質の遺伝情報を有するDNAを保持する組換え体プラスミドを、それぞれpSAGEP3-C265S(Cys-Ser)、pSAGEP3-C265A(Cys-Ala)、pSAGEP3-C265D(Cys-Asp)、pSAGEP3-C265R(Cys-Ara)と命名した(図1参照)。

【0025】実施例2 形質転換体の作成
pSAGEP3-C265S、pSAGEP3-C265A、pSAGEP3-C265D、pSAGEP3-C265Rでエシェリヒア・コリーJM109のコンピテントセルを水中30分間凍融後、42°Cで4.5秒間ヒートショックを行うことにより形質転換し、それぞれ形質転換体、JM109(pSAGEP3-C265S)、JM109(pSAGEP3-C265A)、JM109(pSAGEP3-C265D)、JM109(pSAGEP3-C265R)を得た。

【0026】
実施例3 形質転換体の培養と変異タンパク質の生成
2×YT培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))50mlを500ml フラスコに分注し、121°C、15分間オートクレーブを行い放冷後、別途急冷過した50mg/mlアンビシリン(ナカライトスク製)を0.1g添加した。この培地に上記と同一組成の培地で予め37°Cで18時間振盪培養した形質転換体の培養液1mlをそれぞれ接種し、37°Cで通気搅拌培養した。培養経過を表1に示した。

【0027】
【表1】

(5)

特開平7-163341

7

8

形質転換体	ザルコシンオキシダーゼ活性(U/ml)						OD 660			
	12時間	24時間	36時間	48時間	60時間	12時間	24時間	36時間	48時間	60時間
JM109(pSAOEP3)	1.33	0.81	0.38	0.27	0.17	2.2	2.8	2.8	2.7	2.7
JM109(pSAOEP3-C265S)	1.24	1.46	1.35	1.28	1.16	2.5	2.9	2.8	2.8	2.8
JM109(pSAOEP3-C265A)	1.31	1.88	1.77	1.65	1.51	2.2	3.1	3.0	3.0	3.0
JM109(pSAOEP3-C265D)	0.89	1.31	1.26	1.20	1.10	3.0	3.5	3.5	3.5	3.5
JM109(pSAOEP3-C265R)	1.30	1.38	1.40	1.41	1.23	3.1	3.2	3.2	3.2	2.9

【0028】親タンパク質を生産する形質転換体(JM109(pSAOEP3))は、培養開始より12時間後でザルコシンオキシダーゼ活性がピークとなり、以後、時間経過と共に活性は減少していった。これに対し改変タンパク質を生産する形質転換体は、培養開始より50時間後まで活性の減少はほとんど見られなかった。すなわち、改変タンパク質の生体成分に対する安定性の増強とその効果が明らかとなった。

【0029】また、形質転換体(JM109(pSAOEP3-C265S))を培養液より12,000rpm、5分間の遠心にて分離し、同量の50mM磷酸カリウムバッファー(pH8.0)に懸濁後、90秒間の超音波破碎を行った。この破碎液の安定性評価結果を図2に示した。親タンパク質は破碎液中で不安定であったが、改変タンパク質は4°C或いは25°Cで3日間保存後もほぼ安定であった。すなわち、改変タンパク質の生

* 体成分に対する安定性増強が効果的であることが分かった。

【0030】実施例4 改変タンパク質の精製と金属イオンに対する安定性評価

それぞれの改変タンパク質を、菌体破碎、除核酸、塩析後、イオン交換カラムクロマトグラフィーを実施することにより(Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)参照)、 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて单一のバンドを形成するまで精製した。

【0031】精製された改変タンパク質と親タンパク質の酵素特性の評価結果を表2に示した。

【0032】

【表2】

酵素特性	親タンパク質	改変タンパク質			
		C265S	C265A	C265D	C265R
10分処理の熱安定性(°C)	≤50	≤50	≤50	≤50	≤50
pH-安定性	6.5-10	6.5-10	6.5-10	6.5-10	6.5-10
至適pH	7.5-8.0	7.5-8.0	7.5-8.0	7.5-8.0	7.5-8.0
Km (ザルコシン: mM)	3.9	2.8	2.6	3.4	3.6
比活性(U/mg)	19.8	19.2	16.3	10.1	20.8

【0033】改変タンパク質の酵素特性は、親タンパク質と実質的に変わらず、アミノ酸の置き換えに関し何等問題ないことが分かった。次にそれぞれの改変タンパク質及び親タンパク質をザルコシンオキシダーゼ活性 10U /ml となるように50mM磷酸カリウムバッファー(pH7.5)

に溶解後、10μM濃度となるように硝酸銀或いは塩化銀を添加し、37°C、20~50分後の安定性を調べた。評価結果を表3に示した。

【0034】

【表3】

特開平7-163341

(5)

9

10

金属イオン阻害剤	残存活性 (%)				
	親タンパク質	C265S	C265A	C265D	C265R
10 μM AgNO ₃ 20分間	4.5	62	76	87	44
	60分間	2.8	50	67	85
10 μM HgCl ₂ 20分間	6.5	66	64	56	61
	60分間	5.6	60	60	56

【0035】改変タンパク質は親タンパク質と比べ硝酸銀や塩化水銀に対する安定性が大幅に向上した。すなわち改変タンパク質の金属イオンに対する安定性の増強が明らかとなった。

【0036】

【発明の効果】本発明において遺伝子工学的手法を用いて親タンパク質を構成するアミノ酸配列中のシステイン残基を任意のアミノ酸に置換することにより、金属イオンまたは他の生体成分に対する安定性が増強された改変タンパク質が得られる。本発明の改変タンパク質は、親タンパク質に比べ、培養時、精製時の安定性が著しく向上し、タンパク質の工業的生産に於いて極めて有利なもの。

*のとなる。

【0037】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：389

配列の型：アミノ酸

トボロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アースロバクター・エスピー(Arthrobacter S P.)

株名：TE1826

配列

```

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
    1           5          10          15
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Cln Gly Val Lys Thr
    20          25          30
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
    35          40          45
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
    50          55          60
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Cln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
    65          70          75          80
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
    85          90          95
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
    100         105         110
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
    115         120         125
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
    130         135         140
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
    145         150         155         160
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
    165         170         175
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Cln Thr Ala Tyr
    180         185         190
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn

```

BEST AVAILABLE COPY

(7)

特開平7-163341

11

195

200

205

Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
210 215 220
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
225 230 235 240
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
245 250 255
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
260 265 270
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
275 280 285
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
290 295 300
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
305 310 315 320
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
325 330 335
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
340 345 350
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
355 360 365
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370 375 380
Gln Lys Glu Thr Ile
385

【0038】配列番号：2

配列の長さ：1670

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter s p.)

株名：TE1826

配列の特徴

特徴を表す記号：-35 signal

存在位置：114..119

* 特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：-10 signal

存在位置：237..242

特徴を決定した方法：S

30 特徴を表す記号：CDS

存在位置：298..1464

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：301..1464

特徴を決定した方法：E

他の情報：ガルコシンオキダーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

配列

CTCCAGTTCT TCCCTGGCT TTTGAATCCT CACGGTAACA TAAGATTGAA CATAATTAA 50
ACTTTTGCGC CCCTTTGAAA CGCTGCCATA TTCAACTAACCTTTTGAAAAA TCTGCCAATC 120
TTAATTTCC AAGTATAATC ACTCCCCAAA CGTTCTTTTA CTACTAACAC TAGAATATT 180
CTAAAAGTCAG TACCTGTCTAT CACTTTAACAT GATGCCAAT AGCCCGTATG 240
ATGTAATAG ATAATTAAGA AAATTCAAAT TACCTGTTG AAAAGGAGA GAAAACA 297
ATG AGT ATT AAA AAA CAT TAT GAT GTA ATT GTG GTT GGC GCT GGT TCC 345
Met Ser Ile Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

1

5

10

15

ATG GCA ATG GCA GCT CGG TAC TAT CTG TCT AAA CAA CGT GTT AAA ACA 393

Met Gly Met Ala Ala Glu Ile Asp Ile Ser Ile Lys Glu Val Ile Thr

BEST AVAILABLE COPY

(8)

待明平7-163341

13

14

CTA TTG GAA GAT TCA TTT CAT CCT CCC CAT ACA AAT GGC AGC CAT CAT	441
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His	
35 40 45	
GCC GAT ACA CGG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GGC GAA CGA AGA GAG TAT	489
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr	
50 55 60	
CTA CGG TTT GCC TTG AGA CGA CAA GAG TTA TCG TAT GAA TTA GAA AAG	537
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys	
65 70 75 80	
CAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA CGT GTC CTC GTT TTT CGT	585
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly	
85 90 95	
GCT AAA CGA GAA CGT CCT TTC GCT GCC GAA ACA ATG GAA CGC GCA AAG	633
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys	
100 105 110	
GAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA CGA AGT GAA ATA AAT AAG	681
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys	
115 120 125	
CGT TGG CCA CGT GTC ACC GTT CCT GAG AAT TAT AAT CGT ATT TTT GAA	729
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu	
130 135 140	
AAA AAT TCT CGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT CGC GCT TAC CGT	777
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg	
145 150 155 160	
CAA TTG CGG GAA CGA AAT CGT CGG AAA GTT CTA ACC TAC ACA CCC GTT	825
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val	
165 170 175	
GAA GAT TTC GAG ATT CGC GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC CGC TAT	873
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr	
180 185 190	
GCC TCC TTT ACA CGC AGT AAA TTA ATT GTT ACC ATG CGC CCT TGG ATT	921
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn	
195 200 205	
ACC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC	969
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr	
210 215 220	
CGT CAA GTT GTC CGA TTC TIC GAA TGT GAT GAA AAA AAA TAT AGC AAT	1017
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn	
225 230 235 240	
ACA CAT CGT TAT CGG CGG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT CGC ATC TAT	1065
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr	
245 250 255	
TAC CGA TTT CCA ACC TTC CGC CGC TGG CGC AAA ATA CGC TAT CAT	1113
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His	
260 265 270	
ACG TAT CGT CAA AAA ATC GAT CCA GAT ACC ATT AAT CGT GAA TTT CGT	1161
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly	
275 280 285	
ATT TAC CGG GAG GAT GAA CGG AAT ATT CGC AAA TTC CTG GAA ACA TAT	1209
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr	

(9)

特開平7-163341

15

16

290	295	300
ATG CGG GCA GCA ACC GGC GAA TTA AAA AGT CGG GCA GTT TGC ATG TAC	1257	
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr		
305	310	315
ACA AAA ACA CCT CAT GAG CAT TTC GTG ATT CAT TTA CAT CCT CAA TTC	1305	
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe		
320	325	330
TCG AAT GTC CGC ATT GCA GCG GCA TTC TCC GCA CAT CGG TTT AAA TTC	1353	
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe		
335	340	345
TCA AGC GTA GTT CGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA CCT GTC ACC CCT AAA	1401	
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys		
350	355	360
ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT CGC CCT CCT TTA AAA	1449	
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys		
365	370	375
CAA AAA GAA ACC ATT TAAAAACCCA AGCAAGCCGT ACATAAATTG CGATAGATAT	1504	
Gln Lys Glu Thr Ile		
380	385	
TATGTACGGC TTACTTATT TACAACCTAA AAATCTGGAT ATCAATCTG TCCCTCTACT	1564	
CATTGAAGCA CAAACTGTAC TTCAACGGCT TTTTTTATTAA CTTGTAACCA TAACAGGAAC	1624	
OCTAAATAA GAACACCGCT CCATAAGAAT AGTACCGGAG GAATTC	1570	

【0039】配列番号：3

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：36

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸（DNA）

配列の種類：合成DNA

鎖の数：一本鎖

配列

トポロジー：直鎖状

CCAACCTTCCGGGGCTCCGGCTTGAAAATAAGCTAT 36

配列の種類：合成DNA

【0042】配列番号：6

配列

配列の長さ：36

CCAACCTTCCGGGGCTCCGGCTTGAAAATAAGCTAT

CCAACCTTCCGGGGCTCCGGCTTGAAAATAAGCTAT 36

【0040】配列番号：4

配列の型：核酸（DNA）

配列の長さ：36

鎖の数：一本鎖

配列の型：核酸（DNA）

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

配列

トポロジー：直鎖状

CCAACCTTCCGGGGCTCCGGCTTGAAAATAAGCTAT 36

配列の種類：合成DNA

【図面の簡単な説明】

配列

【図1】 改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAを保

持する組換え体プラスミド〔pSACEP3-C265S (Cys-Ser) ,

pSACEP3-C265A(Cys-Ala), pSACEP3-C265D(Cys-Asp) ,

pSACEP3-C265R(Cys-Arg)〕の構造を示す。

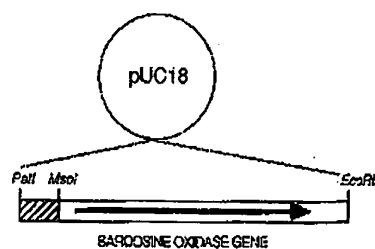
40 pSACEP3-C265R(Cys-Arg) の構造を示す。

【図2】 形質転換体破碎液の安定性評価結果を示す。

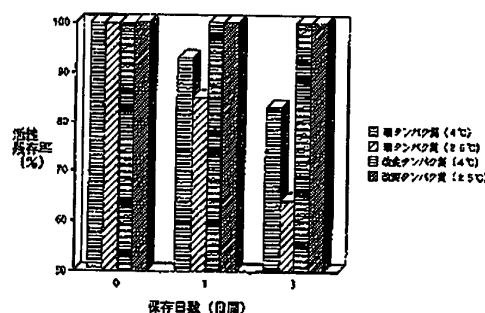
(10)

特開平7-163341

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.^o
// C 07 K 1/07
(C 12 N 9/04
C 12 R 1:19)
(C 12 N 15/09
C 12 R 1:05)

識別記号

庁内整理番号

8318-4H

ZNA

F I

技術表示箇所

C 12 R 1:06)